

⑫ 公開特許公報 (A)

平2-289596

⑤Int.Cl.⁵
 C 07 H 21/00
 C 12 N 15/10
 C 12 P 19/34

識別記号 庁内整理番号
 7822-4C
 Z 8214-4B

⑬公開 平成2年(1990)11月29日

審査請求 未請求 請求項の数 15 (全20頁)

⑭発明の名称 核酸の単離方法

⑮特 願 平2-75323

⑯出 願 平2(1990)3月23日

優先権主張 ⑰1989年3月23日⑯オランダ(NL)⑮8900725

⑰発明者 ウィレム・レネ・ボーメルデ
オランダ国、1079・ヘー・イエー・アムステルダム、キンデルデイクストラート・28・デ・デルデ
⑰発明者 ヘンリエッテ・マリ・ア・アレイダ・アドリ・アーンセ
オランダ国、6828・ペー・エヌ・アーネム、イル・イエー・ペー・ファン・マイルウエイクストラート・87

⑰出願人 アクツ・エヌ・ヴェー オランダ国、6824・ペー・エム・アーネム、フエルベルウェヒ・76
外2名

⑰代理人 弁理士 川口 義雄

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

核酸の単離方法

2. 特許請求の範囲

(1) 核酸を含有する出発材料から核酸を単離するための方法であって、出発材料、カオトロビック物質及び核酸結合性固相を混合し、核酸が結合した固相を液体から分離し、その後、こうして得られた固相-核酸複合体を洗浄し、必要に応じて核酸を該複合体から溶離することを特徴とする方法。

(2) 使用される出発材料が全血、血清、パフィーコート、尿、糞便、脛脊髓液、精液、唾液、組織及び細胞培養液のような、核酸を含有する生物材料であることを特徴とする請求項1に記載の方

(3) 使用されるカオトロビック物質がグアニジニウム塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、

(イソ)チオシアノ酸ナトリウム、尿素又はその相互の組み合わせから構成される群から選択されることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

(4) グアニジニウム塩が(イソ)チオシアノ酸グアニジニウムであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

(5) 使用される核酸結合性固相がシリカ粒子、ポリマー材料、フィルター材料、ポリスチレンビーズ又はニトロセルロース紙から構成される群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

(6) DNA及び/又はRNAを単離することを特徴とする請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

(7) 実質的に0.05~500μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子を使用することを特徴とする請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

(8) 実質的に0.1~200μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子を使用することを特徴とする請求項1

から6のいずれか一項に記載の方法。

(9) 実質的に1~200μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子を使用することを特徴とする請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

(10) 得られた固相-核酸複合体を沈澱させ、かつ上清を廃棄することにより分離し、その後、カオトロピック物質を含有する洗浄用緩衝液で複合体を洗浄することを特徴とする請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

(11) 洗浄用緩衝液で洗った固相-核酸複合体を更に1種以上の有機溶剤で洗浄し、その後、乾燥することを特徴とする請求項10に記載の方法。

(12) 洗浄及び乾燥した固相-核酸複合体中に存在する核酸を溶離用緩衝液により溶離することを特徴とする請求項11に記載の方法。

(13) こうして得られた該固相-核酸複合体を複数の成分の混合物と接触させ、該固相に結合しているか又は該固相から溶離した核酸を増幅することを特徴とする請求項12に記載の方法。

とを特徴とする請求項1に記載の方法。

(14) 請求項1に記載の方法を実施するための手段の組み合わせ。

(15) 請求項13に記載の方法を実施するためのテストキット。

3. 発明の詳細な説明

本発明は核酸を含有する出発材料から核酸を単離するための方法及び手段の組み合わせ、並びに該方法により得られた核酸を増幅(simplify)するためのテストキットに係る。より特定期的には、本発明は全血、血清、バフィーコート(血液の炎症性細胞又は白血球フラクション)、尿、糞便、脛脊髄液、精液、唾液、組織、細胞培養物等のような、核酸を含有する生物材料から核酸を単離するための方法及びキットに係る。上記生物材料から単離された核酸は、サンプルを採取した生物に内在する核酸及び外來性(ウイルス、真菌、細菌又は寄生虫に由来する)核酸も含有し得る。

全血、血清、尿又は糞便のような複雑な出発材料から核酸(RNA)を単離する既知の方法は通常、タンパク質分解酵素の存在下で生物材料を洗剤により溶解させた後、有機溶剤(例えばフェノール及び/又はクロロホルム)で数回抽出し、エタノール沈降させ、核酸を透析することにより実施される。例えば臨床材料から(二重摂)DNAを単離するこれらの既知の方法は多大な労力と時間を必要とする。このような出発材料からRNAを精製するためには比較的多数の段階が必要とされるので、数個の臨床サンプルを同時に処理する場合、サンプル間にRNAが伝播される危険が大きい。核酸増幅法、例えば最も感受性の高いポリメラーゼ鎖反応(PCR, Saiki他、Science 230, 1985, 1350)により例えば病原体(例えばウイルス又は細菌)におけるRNAの存在を後で検出するためにRNAを単離する場合、このように異なるサンプル間でRNAが伝播される危険が大きいと、誤って陽性の結果が生じ、重大な問題である。

題である。

汚染に対して感受性のこのような既知の方法の一例は、組織及び細胞培養物から全RNAを単離するための方法としてAnalytical Biochemistry 162, 1987, 158に記載されている方法である。この方法によると、生物出発材料からRNAを酸性チオシアニン酸グアニジニウム-フェノール-クロロホルム混合物で1回抽出する。粗分離後、更に水相を処理することにより有用な条件下で4時間以内にRNAを回収することができる。

Analytical Biochemistry 162, 1987, 463には、塩酸グアニジンを含有する緩衝液に細胞を分散し、エタノール沈降させることにより、組織及び細胞系からDNAを単離するための方法が記載されている。この方法は汚染に対して感受性であるが、分離したDNAを更に処理してから数時間以内に有用なDNA産物を単離することができる。

しかしながら、これらの既知の方法は複雑な出

発材料(例えば全血及び血清)中では首尾よく使用することができない。

本発明の目的は、既知の方法の欠点を解消するような方法を提供することである。

より特定的には本発明の目的は、種々の生物材料のような複雑な出発材料から核酸(即ちDNA及びノア又はRNA)を未曾有の迅速で簡単且つ再現可能に、しかもその後、分子生物学における反応剤として使用可能な非損傷状態及び高純度で直接(前処理を介さず)単離することが可能な方法を提供することである。

本発明の別の目的は、他のサンプル及び人体に対する汚染の危険が低いという点で既知の方法と異なり、即ち異なるサンプル間におけるNAの伝播の危険を最小にしながら数個の臨床サンプルを同時に処理することが可能な方法、並びに被処理サンプル中に存在し得るウイルス又は細菌が人体に伝染する危険を最小にすることが可能な手段を提

供することである。

これらの目的は本発明に従い、出発材料をカオトロビック物質及び核酸結合性固相と混合し、核酸が結合した固相を液体から分離し、その後、こうして得られた固相-核酸複合体を洗浄し、必要に応じて核酸を該複合体から溶離することを特徴とする、核酸を含有する出発材料から核酸を単離するための方法により実現される。

広義には本発明はあらゆる核酸含有出発材料(ウイルス又は細菌に感染した食品及び類似製品、ワクチン及びミルクを含む)に適用できるが、使用される出発材料が全血、血清、バフィーコート、尿、糞便、扁桃腺液、精液、唾液、組織及び細胞培養物(例えば哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物)のような核酸含有生物材料であるような方法に特に適用される。当然のことながら、本発明の方法はPCR産物又は更に精製を要する別の核酸回収方法の産物のような比較的純粋な出発材料にも

適用できる。しかしながら、核酸含有生物材料の種類によっては(例えば植物材料、ある種のグラム陽性菌並びにある種の酵母及びカビ)は特殊な細胞壁構造によりカオトロビック物質に溶解しないため、出発材料として本発明の方法で直接使用することはできない。従って、このような出発材料は入手形態の細胞に前処理を施す必要があり、例えば予め細胞を溶解させてから得られた溶解物に本発明の方法を実施すればよい。

核酸(NA)なる用語は、任意の可能な構造、即ち二重鎖(ds)核酸、又は一重鎖(ss)核酸、又はその組み合わせ(部分的ds又はss)としてのDNA及びRNAを意味する。

本発明の主眼は、カオトロビック物質の存在下でNAと結合することが可能な核酸結合性固相、例えばシリカ粒子を使用する点にある。シリカなる用語は、 SiO_2 結晶及び他の形態の酸化ケイ素、 SiO_2 から構成されるケイソウ植物の骨格、無定形

酸化ケイ素並びにガラス粉末を意味する。アルキルシリカ、ケイ酸アルミニウム(ゼオライト)、 -NH_2 を有する活性シリカ、ラテックス粒子、キュベットもしくは微量滴定アレートの内壁を形成するある種のポリマー材料、又は例えばニトロセルロースから構成されるフィルター材料も本発明の核酸結合性固相として使用できる。

シリカ粒子の使用に関しては、カオトロビック塩 NaI (ヨウ化ナトリウム)の高濃度溶液中のdsDNAをアガロースから遊離させ、ガラスに結合することが PNAS 76, 1979, 815により知見された。この文献はアガロースゲルからDNAを単離するための2種の方法について記載しており、そのいずれも第1段階でアガロースを溶解するために NaI 溶液を使用している。一方の方法では第2段階でDNAをアセトンで沈降させ、他方の方法では第2段階でDNAをガラス粒子に結合し、その後、水性緩衝液に溶離する。しかしながら、この方法では

体液及び他の生物出発材料のような複雑な出発材料を使用できない。更にこの論文は、本発明の1段階方法については開示していない。

本発明によると、結合し、その後、遊離される高純度の核酸を不純な出発材料から直接得られるように、適当に選択した粒径を有するシリカ粒子を使用することが好ましい。

本発明の好適懸濁液は、実質的に0.05～500μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子を使用することを特徴とする。「実質的に」なる用語は、シリカ粒子の80%以上、好ましくは90%が規定された粒径範囲に該当することを意味する。結合したNAを容易に処理できるようにするために、使用されるシリカ粒子は実質的に0.1～200μmの範囲の粒径を有すると好適であり、使用されるシリカ粒子が実質的に1～200μmの範囲の粒径を有するような方法が最適である。実際に、シリカ粒子のNA結合能は粒子が小さければ小さいほど高いが、特にNA含有量

の高い出発材料の場合、及びNA分子が比較的長い場合は、過度に小さいシリカ粒子を使用すると、形成されるNA-シリカ複合体をそれ以上有効に再分散することができなくなる。換言するならば、結合したNAを純粋な形で複合体から回収することができない。人血を出発材料として使用する場合、0.2～10μmの範囲の粒径を有する非表面シリカを使用すると、このような問題が生じることがある。それ以上再分散することができない凝聚物の形成は、粒径が1～10μmの範囲の分離したシリカを使用することにより避けることができる。しかしながら、細菌培養物のように細胞中の濃度が高い出発材料を使用する場合、このような粗いシリカフラクションの使用は再分散し難い凝聚物の形成を避けるためには不十分であり、2～200μmの粒径を有するケイソウ土のようなもっと粗いシリカを使用すると、最適の結果が得られることが判明した。別的好適懸濁液によると、NA結合性固相はフィル

ター形態であるか、又はサンブルとカオトロビック物質とを収容する容器の一部を形成する。NA結合性固相を後者の形態に選択すると、その後のサンブル処理及びNA単離のために遠心分離又は沪過を実施する必要がなくなる。

本発明によると、シリカ粒子のような上記核酸結合性固相以外にカオトロビック物質を使用することが不可欠である。カオトロビック物質なる用語は、タンパク質及び核酸の二次、三次及び／又は四次構造を変えることが可能であり且つ少なくとも一次構造を無傷にしておくことが可能な任意の物質を意味する。具体例は(イソ)チオシアニ酸グアニジニウム及び塩酸グアニジンである。核酸を含有する出発材料からNAを単離するために、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、(イソ)チオシアニ酸ナトリウム、尿素又はその相互の組み合わせも核酸結合性固相と組み合わせて使用すると非常に好適である。本発明によると、使用されるカ

オトロビックグアニジニウム塩は好ましくはチオシアニ酸グアニジニウム(GuSCN)である。

本発明は通常、出発材料を十分大きい量のカオトロビック物質(例えばグアニジニウム塩)及び例えばシリカ粒子と混合し、出発材料中に存在する核酸のほぼ全體を遊離させ、該シリカ粒子に結合させるように実施される。適当なプロトコールによると、例えば、反応容器中に存在するGuSCN緩衝溶液にシリカ粒子懸濁液を加え、その後、サンブルを加えて十分に混合する。やがて、細胞が溶解し、ウイルスが存在する場合はウイルスも溶解し、遊離したNAがほとんど即座にシリカ粒子に結合する。次に、形成されたシリカ-核酸複合体を例えば迅速沈澱(遠心分離)及び上清の廃棄(例えば吸引による)により液体から分離し、その後、複合体(例えばシリカ-核酸ペレットの形態)を例えばボルテックスミキサーを使用してカオトロビックグアニジニウム塩を含有する洗浄用緩衝液で洗

浄(再分散又は均質化)し、再び沈殿させる。好ましくは、洗浄用緩衝液で洗ったシリカ-核酸複合体を更にアルコール水溶液(収率の損失を制限するために最適には約70%エタノール)及びアセトンで洗い、その後、(例えば加熱下に)乾燥してアセトンを除去する。次に、洗浄及び乾燥したシリカ-核酸複合体中に存在するNAを水性溶離用緩衝液(elution buffer)により溶離する。溶離用緩衝液の選択は単離されたNAの使用目的に応じて決定される。適当な溶離用緩衝液の例はTE緩衝液、2回蒸留水(aqua bidest)及びPCR緩衝液(「材料及び方法」の項参照)である。好ましくは、これらの全段階を单一の反応容器(例えば容量1.5mLのポリプロピレン製エッペンドルフチューブ)中で実施し、比較的少量、例えば100μL未満の精製NAを回収する。こうして単離したNAは核酸分解酵素を含有せず、DNAポリメラーゼ(例えばTaq-DNAポリメラーゼ)、DNA制限酵素、DNAリガーゼ及び逆転写酵素(例

染の危険が非常に低い。ウイルス又は細菌に感染している可能性のある材料の処理に伴う人体への危険は、サンプルを反応容器に入れる単離過程の第1段階にはほぼ限定される。この第1の処理において、潜在的に存在する病原体は有効に不活化される。本発明の方法は特殊な閑辺技術(ボルテックスミキサー、12000gエッペンドルフ型の遠心分離機及び水浴又はエッペンドルフ加熱ブロックが標準実験技術に属する)も生化学の専門的知識も必要としないので、多数のサンプルから機械的にNAを単離するため、換言するなら自動化に非常に適している。本発明の方法を使用すると、10個以上、あるいは24個以上の異なるサンプルを約1時間で処理することができる。

本発明は核酸を含有する出発材料から核酸を単離するための方法のみならず、そのための手段の組み合わせ及び該方法により得られた核酸を増幅するためのテストキットにも係る。

えばANV逆転写酵素)のような種々の酵素の基質として直接使用できるような高純度を有する。

本発明の方法によると、PCR法又はヨーロッパ特許第EP0329822号に記載されている所謂NASBA法(NASBA=核酸配列に基づく増幅)のような増幅方法によりNA配列を証明できる程に、例えば血漿及び血球を予め分離することなく約45分間に50μLの全血から十分な量のNAを単離することができる。一方、本発明は血清、糞便、尿等のようなNAを含有する他の種々の生物材料にも適用することができる。このため、本発明は細菌及びウイルス感染の診断において、並びに出生前診断及び遺伝性腫瘍体質の診断の領域における遺伝的多形性の研究において有用である。

本発明のNA単離方法は、全手順を单一の反応容器中で実施することができ、方法の第1段階で粗出発材料から遊離したNAが完全な別の精製過程の間に少なくとも固相の大部分に結合するので、汚

染の危険が非常に低い。ウイルス又は細菌に感染している可能性のある材料の処理に伴う人体への危険は、サンプルを反応容器に入れる単離過程の第1段階にはほぼ限定される。この第1の処理において、潜在的に存在する病原体は有効に不活化される。本発明の方法は特殊な閑辺技術(ボルテックスミキサー、12000gエッペンドルフ型の遠心分離機及び水浴又はエッペンドルフ加熱ブロックが標準実験技術に属する)も生化学の専門的知識も必要としないので、多数のサンプルから機械的にNAを単離するため、換言するなら自動化に非常に適している。本発明の方法を使用すると、10個以上、あるいは24個以上の異なるサンプルを約1時間で処理することができる。

即ち、本発明の手段の組み合わせは例えば次の4成分、即ち

成分1: (イソ)チオシアノ酸グアニジニウム含有する溶離用緩衝液(lysis buffer)、(b)実質的に0.05~500μm、好ましくは0.1~200μm、最適には1~200μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子の水性懸濁液、(c)(イソ)チオシアノ酸グアニジニウムを含有する洗浄用緩衝液、及び必要に応じて(d)溶離用緩衝液を含む。

即ち、本発明の手段の組み合わせは例えば次の4成分、即ち

成分1: (イソ)チオシアノ酸グアニジニウム緩衝液、
成分2: シリカ粒子の懸濁液、
成分3: 洗浄用緩衝液、及び(場合によって)

成分4: 溶離用緩衝液

から構成され得る。

必要に応じて成分1及び2と一緒にしてもよいが、

その場合、貯蔵寿命が制限される。

本発明のHA単離方法で使用することが好ましい他の反応剤、例えばエタノール及びアセトンは標準実験技術に属する。

以下、多数の実施例により本発明を説明する。先ず、使用される材料と方法について説明する。

(以下省略)

れた。更に、酸性(pH約2)のシリカをオートクレーブ処理すると、任意に存在する核酸が完全に分解される結果となる。このように得られたシリカ粗材の懸濁液を以下SCと表記する。

シリカ誘導体の懸濁液

2~18個の炭素原子の長さのアルキル末端を有するメチルアクリラミド二酸化ケイ素を用いてシリカを誘導体化した。誘導体化したシリカの粒径は83~200μmであった。使用した粒子の孔径は500Åであった。上記シリカ誘導体(12MAAMC₂-C₁₁)はDiosynth,0ssから供給された。

HA単離のために(実施例II)、誘導体化したシリカ粒子0.5gを2回蒸留水1ml中に懸濁させた。このシリカ懸濁液を、32%(w/v)HCl 120μlを用いて90°Cで30分間予備処理した。

ポリスチレンラテックス粒子の懸濁液

2種類のポリスチレンラテックス粒子を使用した。ポリスチレンラテックスYQ69レッドはナトリ

材料及び方法

A)シリカ粗材(SC)の懸濁液

粒径分布0.5~10μmで且つその80%が1~5μmのSigma製の二酸化ケイ素(SiO₂)を使用した。シリカ60gを直径5cmのシリンドーに入れた2回蒸留水(最高500ml)中に懸濁させると、水柱の高さは27.5cmとなった。室温で25時間1x g沈降させた後に、70mlを残して上澄みを吸引して除去した。2回蒸留水を500mlになるまで加え、シリンドーを振搗することにより粒子を再度懸濁させた。5時間1x g沈降させた後、60mlを残して上澄みを吸引して除去した。32%(w/v)HCl 800μlを加えた後、溶形成することにより再度懸濁させた。この懸濁液を8ml容器に入れて4mlアリコートをつくり、密封し、オートクレーブ内で121°Cで20分間加熱した。この沈降プロトコルによって、粒径1μm以上より大きなシリカ粒子を豊富に得ることができた。これは電子顕微鏡検査によって立証さ

ウムードデシルスクシネットスルフェート基を吸収させており、粒径は424nmを有した。ポリスチレンラテックスYQ58Bはより小さい粒径(328nm)を有し、外観にスルフェート基を吸収していないかった。

3種の親水性のグリシンジルメタクリレートポリスチレンラテックス粒子を使用した。AGP27C、ACN3レッド及びACY1515の粒径はそれぞれ933nm、206nm及び846nmであった。上記全てのポリスチレン粒子はARLA-Arnhemより供給のものであった。

市販フィルター

以下のものを使用した。

1. PVDF Millipore提供のImmobilon Transfer Membrane(疊水性)、
2. Schleicher and Schuell提供のNitro-cellulose(0.2μm 参照番号401,396)、
3. Hybond-N Amersham提供のNylon Hybridization膜(0.45ミクロン、ロット:16872)。

D) L2級衝液

TRIS(Boehringer)12.1gを2回蒸留水800mL中に溶解し、37% (w/v) HCl 8.1mLを加え、さらに容積1リットルになるまで2回蒸留水を加えることにより、L2級衝液(0.1M Tris.CE, pH6.4)を調製した。

E) 洗浄液L2*

GuSCN(Fluka製のチオシアノ酸グアニジン)120gをL2級衝液100mL中に溶解することにより、洗浄液L2*を調製した。

F) 洗浄液L2*

KI(Merck製のヨウ化カリウム)12.45gをL2級衝液25mL中に溶解することにより洗浄液L2*を調製した。

NaIベースのカオトロビック物質を調製するためには、NaI(Merck製のヨウ化ナトリウム)11.25gをL2級衝液25mL中に溶解した、チオシアノ酸ナトリウムベースのカオトロビック物質を調製するため

に、NaSCN(Baker)6.1gをL2級衝液25mL中に溶解した。

KI及び尿素(8M)を含有するカオトロビック物質を調製するために、KI 12.45g及び尿素12.0gをL2級衝液(25mL)中に溶解した。同様に、尿素及びNaIを併有するカオトロビック物質と、尿素及びNaSCNを併有するカオトロビック物質とを調製した。

G) 溶解用緩衝液L5

GuSCN 120gをL2級衝液100mL中に(約80°Cの温水浴中で静かに振盪させて)溶解し、次いで40% (w/v) デキストラヌスルフェート(Pharmacia LKB)溶液26.0g、0.2M EDTA pH8 22mL及びTriton X-100(Packard)2.8gを加え、次に溶液を均質化することにより、溶解用緩衝液L5を調製した。0.2M EDTA pH8溶液は、EDTA37.2g(Merck製のTitriplex)37.2g及びNaOH(Merck)4.4gを水500mL中に溶解することにより調製した。

H) 溶解用緩衝液L6

GuSCN120gをL2級衝液100mL中に(80°Cの水浴中で静かに振盪させて)溶解し、次いで0.2M EDTA pH8 22mL及びTriton X-100(Packard)2.8gを加え、次に溶液を均質化することにより、溶解用緩衝液L6を調製した。

I) 溶解用緩衝液L6*

KI(ヨウ化カリウム、Merck)12.45gをL2級衝液25mL中に(40°Cの水浴中で静かに振盪させて)溶解し、次いで0.2M EDTA(pH8.0)5.5mL及びTriton X-100(Boehringer 789704)0.65gを加え、最後にこの溶液を均質化することにより、溶解用緩衝液L6*を調製した。同じ方法を適用してNaI(ヨウ化ナトリウム、Merck)を含む溶解用緩衝液L6*、及びNaSCN(チオシアノ酸ナトリウム、Baker)を含む溶解用緩衝液L6*を調製した。

KI及び尿素を併有する溶解用緩衝液L6*を、KI(ヨウ化カリウム、Merck)12.45g及び尿素(Cibco BRL)

12.0gをL2級衝液25mL中に溶解することにより調製した。次いで、0.2M EDTA(pH8.0)5.5mL及びTriton X-100(Boehringer)0.65gを加え、この混合物を均質化した。同じ方法を使用してNaI/尿素及びNaSCN/尿素を調製した。

J) 溶解用緩衝液GEDTA

GEDTAとは、GuSCN 120gを0.2M EDTA pH8 100mL中に溶解した溶液を意味する。

K) TE緩衝液

溶出(elution)に適した緩衝液は、所望であればRNAsin(Promega)0.5U/ μ Lを含有する、pH7.5の10mM Tris.CE、1mM EDTA溶液(TE緩衝液)である。

L) 試験管

溶解用緩衝液900 μ L及びNAキャリヤ(ラテックスビーズもしくはSCのごときシリカ、または珪藻土)40 μ LをEppendorff遠心分離管(タイプ3810、1.5mL)に加えることにより、抽出過程と同じ日に試験管を準備した。

I) 洗浄方法

洗浄液1mlを加え、次いでペレットが再度懸濁するまで満形成し、12000×gで15秒間遠心分離し、更に吸引によって上澄みを廃棄することにより、ペレットを洗浄した。

II) 滲出方法

滲出は、少なくとも25μl、好みくは少なくとも40μlの溶出用緩衝液を加え、短時間(2秒間)満形成し、56°Cで10分間インキュベートすることにより実施した。

III) アプロトコルB

このプロトコルは、ヒト血清、全血、水様便または尿といった複合出発材料からdsDNAを単離するのに適しており、EDTA 900μl及びSC 40μlを含むEppendorff試験管を使用した。

1. ペレットが再度懸濁するまで試験管に満形成し、
2. 出発材料(例えば血清、全血、便または尿)50

Eppendorff試験管を使用した。

1. ペレットが再度懸濁するまで試験管に満形成し、
2. 出発材料(血清、全血、便または尿)50μlを加え、直ぐに満形成(約5秒間)して均質化し、
3. 室温に10分間放置し、5秒間満形成し、
4. 12000×gで15秒間遠心分離し、吸引によって上澄みを廃棄し、
5. ペレットをL2で2回洗浄し、
6. ペレットを70%エタノールで2回洗浄し、
7. ペレットをアセトンで1回洗浄し、
8. ペレットを、蓋を開放して56°Cで10分間乾燥し、
9. 必要によってはRNasinの存在下に、TE緩衝液50μlを用いてNAを溶出し、
10. 12000×gで2分間遠心分離すると、上澄みはNAを含有した。

アプロトコルY

uLを加え、直ぐに満形成して(5~10秒間)均質化し、

3. 室温に10分間放置し、5秒間満形成し、
4. 12000×gで15秒間遠心分離し、吸引によって上澄みを廃棄し、
5. ペレットをEDTAで1回洗浄し、
6. ペレットを70%エタノールで2回洗浄し、
7. ペレットをアセトンで1回洗浄し、
8. ペレットを、蓋を開放して56°Cで10分間乾燥し、
9. RNasinを含まないTE緩衝液50μlを用いてNAを溶出し、
10. 12000×gで2分間遠心分離すると、上澄みはNAを含有した。

アプロトコルY

このプロトコルは、ヒト血清、全血、水様便または尿といった複合出発材料からNAを単離する(同時にdsDNA、ssDNA、dsRNA及びssRNAを精製する)のに適しており、L6 900μl及びSC 40μlを含む

このプロトコルは、ヒト血清、尿またはバクテリア培養液といった複合出発材料からNAを単離するのに適している。

方法:

L6 900μl及びSC 40μlを含むEppendorff試験管を使用した。

1. ペレットが再度懸濁するまで試験管に満形成し、
2. 出発材料(血清一プラスミド、尿一プラスミド混合物または一晩培養したバクテリア培養液)50μlを加え、直ぐに満形成(5秒間)して均質化し、
3. 混合しながら室温に10分間放置し、
4. 14,000×gで15秒間遠心分離し、吸引によって上澄みを廃棄し、
5. ペレットをL2*洗浄液で2回洗浄し、
6. ペレットを70%エタノールで2回洗浄し、
7. ペレットをアセトンで1回洗浄し、
8. ペレットを、蓋を開放して56°Cで10分間乾燥

し。

9. 必要によってはRNAsinの存在下に、TE緩衝液(10mM Tris-1mM EDTA pH8.0)50μlを用いてNAを溶出し、

10. 14,000×gで2分間遠心分離すると、上澄みはNAを含有した。

プロトコルY**

このプロトコルは、カオトロビック物質としてのGuSCN、及びNAを結合できるフィルター(材料及び方法の項参照)の存在下に、NAを単離するのに適している。NA検出は、このフィルターをポリメラーゼ連鎖反応混合物に直接適用することによる、ポリメラーゼ連鎖反応によって実施し、從ってフィルターからNAを予め溶出しない。

方法:

LG溶解用緩衝液900μl及びフィルター(寸法1cm×1cm)を含むEppendorff試験管を使用した。

1. 核酸含有溶液50μlを加え、試験管を短時間満

1. ベレットが再度懸濁するまで試験管に満形成し、

2. 出発材料(血清、全血、便または尿)50μlを加え。直ぐに満形成(約5秒間)して均質化し、

3. 室温に10分間放置し、5秒間満形成し、

4. 12000×gで15秒間遠心分離し、吸引によって上澄みを廃棄し、

5. ベレットをL2で2回洗浄し、

6. ベレットを70%エタノールで2回洗浄し、

7. ベレットをアセトンで1回洗浄し、

8. ベレットを、蓋を開放して56°Cで10分間乾燥し、

9. 必要によってはRNAsinの存在下で、TE緩衝液50μlを用いてNAを溶出し、

10. 12000×gで2分間遠心分離すると、上澄みはNAを含有した。

N)出発材料

実施例は、出発材料の性質に応じて(特にセク

形成し、

2. 混合しながら室温に10分間放置し、

3. 上澄みを廃棄し、

4. フィルターをL2洗浄液で2回洗浄し、

5. フィルターを70%エタノールで2回洗浄し、

6. フィルターを、蓋を開放して56°Cで10分間乾燥し、

7. フィルターの小片をポリメラーゼ連鎖反応浴液に直接加えた。

H)プロトコルZ

このプロトコルは、ヒト血清、全血、水様便または尿といった複合出発材料からNAを単離するのに適しており、L5 900μl及びSC 40μlを含むEppendorff試験管を使用した。単離したNAはハイブリッド形成反応に使用することができるが、制限酵素に対する基質としてはやや適当でない。しかしながらT4 DNAリガーゼは活性である。プロトコルYと比較してプロトコルZではNAの収率が高くなる。

ションA～D)、以下のようなセクションに分割した。

セクションA:ヒト血清

セクションB:ヒト全血

セクションC:ヒト尿

上記セクションA、B及びCは特に、dsDNA及びssRNAの両方を純粋形態で単離できることを示す意味がある。

セクションD:ヒト便

このセクションDは、特にdsRNAも単離できることを示す。

セクションE:一重鎖DNA

このセクションEは、本発明が、ssDNAを単離するために使用できることを示す実験からなる。

セクションF:珪藻土

このセクションFは、珪藻土の骨格が本発明に使用するシリカ粒子として非常に有効であることを示す。更に、本発明が、種々のグラム陰性菌か

らNAを単離するために使用できることも示す。

セクションGは、種々のカオトロビック物質を使用し、細胞からNAを精製できることを示す。

セクションH及びIは、別の固相を使用するDNAの単離を示す。

常に50μlの量で使用した。セクションB及びFに使用した血液は常に、凝固を防止するためにEDTAの存在下に採取した鮮血とした(Terumo N.V., Leuven,ベルギーのVenoject装置、タイプVT-574 TKZの採取管を使用)。他のセクションに使用した出発材料(血清、尿及び涙)は冷凍液であった。実施例A1、A2、A3、B1、B2、B5、B7及びF1において、血清または血液は同じ被検体由来であった。

①他の方法

ゲル電気泳動調査に対して、溶出した量のNAの一部を、Kaijii及びBorstが記載した(Biochim. Biophys. Acta 289, 1972, 192)緩衝液系に真化工チウム1μg/mlを含有する中性アガロースグル上に

いてクローニングされた0.9kb Epstein BarrウイルスDNA断片を含む。緩和環状(CII)分子(relaxed circular molecules)を豊富に含むプラスミド調製物を得るために、pEBV-10 DNA(2.9kb)をDNaseIで処理した。成分Ⅱ分子は、3.2kb緩和環状DNA分子としてビリオン中に存在するB型肝炎ウイルスDNAの精製のためのモデルの役目をする。

pGen3p24は1.45kb HIV配列を含むが、pGen3p24の構成は以下に記述する。

HIV HXB2 DNAの配列は数人が記述している(J. Virol. 51, 833-837(1987); Nature 326, 711-713 (1987); Aids Res. Hum. Retrovirus 3, 41-55(1987); Aids Res. Hum. Retrovirus 3, 33-39(1987)及び Science 237, 888-893(1987))。

HIV HXB2 DNAの一部をFok Iで、もとのHIV HXB2配列の1189及び2613部位で切断した。タクレオチド番号は遺伝子バンク指定を参照されたい。

このフラグメントのFok I部位を、クレノウ

ロードした。ゲルにUV照射して写真撮影した。

いくつかの実験において、既知量の精製DNA(インサートDNA)を臨床試料に加えた。これらのケースにおいて、抽出効率100%に対応する量のインサートDNAを同じゲルにロードした。

Ish-Horowicz及びBurkeが記載したように(Nucleic Acids Res. 9, 1981, 2989)、Escherichia coli HB101から細菌プラスミドDNAを精製し、Sephadex CL 2B(Pharmacia, Inc.)を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、エタノールで沈澱させた。Birnboim及びDolyが記載したように(Maniatis, T. ら, Molecular Cloning, CSH, ニューヨーク)、Escherichia coli JM101(J. Messing, Rec. DNA Techn. Bull. 2:43-48(1979))から細菌プラスミドDNAを精製した。pCMV-Eは、2kbベクターpHC B24(Boros in gene 30, 1984, 257)においてクローニングされた0.4kbヒトサイトメガロウイルスDNA断片を含み、pEBV-10は、同じベクターにお

(Klenow)DNAポリメラーゼ(Maniatis, 上記参照)を使用して充填し、プラスミドpUC-19のボリリン酸-Sma I部位においてクローニングした(Maniatis, 前記参照)。HIV HXB2 DNAフラグメントを担う得られたプラスミドをpUC19-p24と称した。

プラスミドpGen3p24を得るために、pUC19-p24の1450bp EcoRI-BamHIフラグメントをEcoRI-BamHI消化ベクターpGen3においてクローニングした(2867bp; Promega Corporation, Madison USA)。

PCR法に使用したプライマーをオリゴシンセサイザーオリゴ-synthesizer装置(Applied Biosystems社)において合成した。プライマーES47(25mer)及びES75(47mer)のタクレオチド配列を以下に示す。

ES47

10 20
ACAGGACCG ACATACACT ATTAC

ES75

10 20 30 40
AATTCTATA CGACTCACTA TAGGGCCTCG CTTTAATTTT ACTCGCTA

ほとんどのRNA単離実験において(実施例A3、B5、B6、B7、C2、D1、E1、F1及びF2)、精製過程の間のRNAの分解を回避するために溶出用緩衝液中にRNAsinを任意に使用する以外には、予防策を講じなかつた。臨床試料を試験管に付加する際にのみ手袋をはめ、試薬の調製に対してはRNase阻害剤を使用せず、オートクレーブ処理しないEppendorf容器及びビペットチップを使用した。特に実施例F1及びF2は、溶出の際のRNAsinの存在は歯齒には必要でないことを示した。

使用した酵素は市場入手可能であり、製造業者が推奨するままに使用した。RNase A同様に全ての耐熱酵素T4リガーゼ及びAMV逆転写酵素はBoehringer(Mannheim)製であった。Tag-DNAポリ

(lysing)特性、及びカオトロピック物質GuSCNの存在下にNAを結合するシリカの特性に起因し、かかる方法でNA非含有の緩衝液が得られる。カラム自体は、例えば500°Cまたはそれ以上で1時間以上加熱することにより、核酸非含有にすることができる。

P) DNAタイプ

C I : 共有結合環状DNA(プラスミド)、

C II : 緩和(ニック)環状DNA(プラスミド)、

C III : 線状DNA(線状化プラスミド)、

L MM : 低分子量DNA(<0.5kb); pHC 624のHpa II消化、471bp、404bp、242bp(2フラグメント)、190bp、147bp、110bp、87bpのフラグメント及び数個のより小さい不定長のフラグメント、

H MM : 中分子量DNA(0.5~29kb); ファージλDNAのHind III消化、23kb、9.4kb、8.7kb、4.4kb、2.8kb、2.0kb及び0.50kbのフラグメント

メラーゼはCetus Inc製とした。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はPerkin Elmer Cetus DNA-熱循環器を用いて実施した。

種々の用途に対しては、本発明の方法に使用する試薬、特にNAキャリヤー(例えはシリカ粒子)及びカオトロピック物質を含む溶解用及び洗浄用緩衝液は、核酸(例えはNA含有の細菌またはウイルス)によって汚染されるべきではないことは基本的に重要である。これは、NAキャリヤーに対しては、これをオートクレーブ内で121°Cで20分間加熱することにより保証され得る。しかしながら、この方法はGuSCN含有の溶解用及び洗浄用緩衝液(GEDTA、L5、L6及びL2)においては、活性が失われる可能性があること、及び環境に対する付随的な危険性があることから有効ではない。上記試薬を(出来る限り)核酸を含有しないようにするために、かかる試薬を本発明のシリカ粒子のカラムに通すことができる。GuSCN含有緩衝液の溶解

ト、

H MW : 高分子量DNA(>29kb)、

ssDNA : ファージM13mp9—重鎖DNA(Boehringer)。

(以下余白)

セクションA：ヒトの血清からのDNA/RNAの精製

ヒトの血清には例えばウイルス又は細胞中にNAが存在し得る。これらの有機体は共に遊離形態で生じ得、更には免疫複合物中に結合して生じ得る。NAの量は通常非常に少ないので、アガロースゲル電気泳動及びエチジウムプロミド／NA複合体の紫外線照射を通じての検出は不可能である。DNAをヒトの血清から精製できることを示すために、微量の精製DNAを血清に加え、次いでアプロトコルBに基づいてDNAを単離した（実施例A1,A2）。DNA及びRNAをヒトの血清から同時に精製できることを示すために、培養した哺乳動物細胞又は（小さなプラスミドを有する）細菌を血清に加え、次いでアプロトコルYに基づいてNAを単離した（実施例A3）。最後に実施例A4は、アプロトコルYによりヒトの血清に存在するRNAをHIV（ヒトの免疫不全ウイルス）から精製でき、またPCR法により検出できることを示している。実施例A5は、ヒトの血清中のDNA

をアプロトコルY*により、核酸結合性固相としてのシリカと共に種々のカオトロピック物質を使用して精製できることを示している。

実施例A1：ヒトの血清からのDNAの精製

ヒトの血清（500μl）を既知量の精製DNA[100μg LMM(45μg)、20μg MMW(20μg)、40μg C1/II(20μg)]と混合し、10個の65μl試料をアプロトコルBに基づき10個のDNA抽出物用インプット材料（input material）として使用した。この実験では試験管中に存在するSC(Silica Coarseの懸濁液）の量を2.5～40μlで変動させた。抽出を二重に実施し、各試料からの溶離DNAの半分（30μl）を1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけた。比較として、インプットDNAの半分の量を同様にコントロールレーン(lanes)の同一ゲル上にロードした。

SCの量が10μlを越えると、二重頭DNA、線状（23kb～約60bp）共有結合閉鎖(CI)DNAも緩和環状

(CII)DNAも効率的に単離された。最大MMWフラグメント（約23kb）の収率はより小さなフラグメントと比較して比較的低いようである。このことは他の実験から考慮すると、分子量の大きいフラグメントのせん断のせいであろう。

コントロールレーンはそれぞれ、100%の抽出効率の場合のLMM,CII/CI及びMMW DNAの量を示している。前述した如く、CIに富む(DNAse Iで処理した)3kbプラスミド(pEBV-10)をインプット材料として使用した。

実施例A2：ヒトの血清から単離したDNAは制限酵素及びT4DNAリガーゼに対して良好な基質であること

精製DNA調製物を50μlのヒトの血清試料12編に加えた。アプロトコルBに基づいてこれら12個の混合物からDNAを単離した。50μlのTEで溶離を実施した。溶離したDNAの半分を以下の3種の制限酵素：EcoRI,BamHI,BglII（これらはそれぞれ低塩、

中塩及び高塩緩衝液で活性を有する）のいずれかで（二重に）処理するか、T4 DNAリガーゼで処理するか、又は処理しなかった。DNA試料を1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけ、紫外線照射により可視化した。

T4リガーゼ処理（37℃で1時間、30μlの反応容量中に3単位のT4リガーゼ）の結果は、DNAフラグメントの分子量のシフトを示すと共に、ヒトの血清から単離したDNAがエキソヌクレオリティックな(exonucleolytic)分解の影響をそれほど受けないことを示している。

精製プラスミド(pCMV-E; 3.3μg; 1.5μl)を加えた8編の血清試料の結果はそれぞれ、EcoRI,BamHI,BglIIダイジェストに対して既ての制限酵素がプラスミドを線状化したことを示している。全ての制限酵素は9単位の酵素と共に、37℃で1時間30μlの反応容量中でインキュベートした。

実施例A3：ヒトの血清からのDNA及びssRNAの同

ヒトの血清には(例えばウイルス、細菌又は細胞中に)、エチジウムプロミドで染色したゲルの紫外線照射によっては検出することのできない非常に少量のRNAしか存在しないので、外因性RNA源をヒトの血清試料に加えた。哺乳動物の細胞又は細菌を外因性RNA源として使用した。プロトコルYに基づいてNAを試料から単離し、RNaseA(40ng/ μL の溶離用緩衝液)の存在下で又は不在下で、0.5U/ μL のRNasinを含む50 μL のTEで溶離した。1%アガロースゲルを支持体とするその後の電気泳動の結果は、RNA及びDNAが検出できることを示している。50 μL の血清試料に対して加えた哺乳動物の細胞は 5×10^5 ラット10B細胞(Boon等、J.Cen.Virol. 89, 1988, 1179)であり、50 μL の血清に対して加えた細菌はプラスミドpCMV-Eを含むE.coli細胞株HB101の100 μL 一晩培養物の細胞ベレットであった。

μL にした。1UのTag-DNAポリメラーゼを加えて、增幅を開始した(1サイクルは95°Cで1分間、55°Cで1分間、72°Cで2分間からなる)。20、25、30、35サイクルで反応混合物から10 μL のアリコートを採取して、2%アガロースゲルに適用した。逆転写酵素で処理した患者FのRNAについては既に25サイクル後に予期される330 bp HIVアンブリマー(amplicon)フラグメントが確認され、HIV RNAが患者の血清に存在することを示唆していた。

実施例A5：数種のカオトロビック物質を用いる

DNA精製

50 μL のヒトの血清試料10個を、CI及びCII形態(方法の項参照)からなるそれぞれが10 μg の精製pGem3p24 DNAと混合した。これら10個のプラスミド／血清混合物を、プロトコルY*に基づいて抽出用インアット材料として使用した。使用したカオトロビック物質の濃度については表A5.1を参照のこと。

実施例A4：ヒトの血清から単離したヒトの免疫不全ウイルスRNAの検出用ポリメラーゼ連鎖反応

プロトコルYに基づいて各々が50 μL のヒトの血清試料2個(患者F,H)からNA(75 μL)を単離した。患者Fの血清は(Abbott研究所のHIV P24抗原固相免疫検定法に基づく)多量(2700pg/ml)のHIV抗原P24を含んでいたが、(Abbott研究所のHIV抗体ELISAに基づく)HIV抗体に対しては陰性であった。患者Hの血清は両方の試験で陰性であった。

単離したNAの一部(43 μL)を37°Cで90分RNaseを含まないDNase(Boehringer;1U DNase/ μL)で処理した。エタノールでの沈澱及び68°Cで15分間の熱不活化の後に、RNAを15 μL のTE緩衝液に懸濁した。このRNA調製物の一部5 μL を、HIV特異的プライマーの存在下において、0.4U/ μL のAMV逆転写酵素(42°Cで30分；反応容量20 μL)で処理するか又は処理しなかった。次いで、dNTPsを含む80 μM の1.25×濃縮PCR緩衝液を加えて、反応容量を100

抽出後に、各試料から溶離したDNAの25%を0.8%アガロースゲル上で分析した。プラスミドDNA回収の定量化を可能とするために、インアットDNAを同様に同一ゲル上に直接ロードした。

電気泳動後にゲルを紫外線照射下で撮影し、DNA回収効率をプラスミド帶強度(表A5.1の表の説明を参照)を基に視覚的に評価した。

カオトロビック物質としてHaeI及びNaSCNを使用して、同様に実験を実施した(下記の試料の説明を参照)。

表A5.1

シリカと共に種々のカオトロビック物質を使用しての、ヒトの血清試料から得られるプラスミドDNAの回収効率

| 試料番号 | 使用したカオトロビック物質 | pGem3p24:CIIの回収 | pGem3p24:CIの回収 |
|------|---------------|-----------------|----------------|
| 1 | GUSCN | ++ | + |
| 2 | KI 3H | - | - |

| | | | |
|----|---------------|----|---|
| 3 | KI 3M/尿素1M | - | - |
| 4 | KI 3M/尿素8M | ++ | + |
| 5 | NaI 3M | - | - |
| 6 | NaI 3M/尿素1M | - | - |
| 7 | NaI 3M/尿素8M | ++ | + |
| 8 | NaSCN 3M | - | - |
| 9 | NaSCN 3M/尿素1M | ± | ± |
| 10 | NaSCN 3M/尿素8M | ++ | + |

表の説明：

表に記載のカオトロビック物質を使用して、前述したように10個の検出可能試料を製造した。

-：回収されない。

±：ほとんど回収されない。

+:目に見えるほど回収される。

++：定量的に回収される。

表A5.1での結果は、8M尿素を組み合わせた3M KI、3M NaI又は3M NaSCNをカオトロビック物質として使用すると、共有結合閉鎖(CI)及び緩和環状(CII)pGex3p24 DNAが効率的に単離されることを示している。

この実験では、試験管に存在するSC(シリカ粗材の懸濁液)の量を2.5~40μlの間で変動させた。抽出を二重に行い、各試料からの溶離DNAの半分(30μl)を、1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけた。比較のために、インプットDNAの半分の量を同様に同一ゲル上にロードした。

10μlを越えるSCを使用すると、二重鎖DNA、線状共有結合閉鎖(CI)DNAも緩和環状(CII)DNAもヒトの全血から効率的に単離された。全血から回収されるDNAの量は、約10μlまではSCの量に比例していた。量が多くなると飽和するようである。

実験例B2：ヒトの全血から単離したDNAは制限酵素及びT4 DNAリガーゼに対して良好な基質であること

精製DNA調製物を、50μlのヒトの血液試料12個に加えた。プロトコルBに従ってこれら12個の混合物からDNAを単離した。50μlのTEで溶離が生じた。溶離したDNAの半分を以下の3種の制限酵素

示している。CIIの收率はCIと比較して比較的高いようである。

セクションB：ヒトの全血からのDNA/RNAの精製

1mlのヒトの血液は、核生成せず従って血漿のNA量に寄与しない約5×10⁹の赤血球を含んでいる。血液のNA量は主に白血球細胞(約4-10×10⁸/ml)により決定される。多量のタンパク質(血液中、約70mg/ml)を含む水性媒体(血漿)にこれらの細胞が埋め込まれている。従って、全血はNA精製にとって極めて不純な源である。セクションBの実施例は、にもかかわらずNAをプロトコルB及びYにより全血から単離することができることを示している。

実験例B1：ヒトの全血からのDNAの単離

ヒトの血液(500μl)を、既知量の精製DNA[100μgのLHM(45μg)、80μgのCI/II(40μg)]と混合し、88μlの試料10個をプロトコルBにおける10個のDNA抽出用インプット材料として使用した。

：EcoRI, BamHI, BglII(これらはそれぞれ低塩、中塩及び高塩緩衝液で活性を有する)のいずれか1つで処理するか、T4 DNAリガーゼで処理するか、又は処理しなかった。DNA試料を1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけ、紫外線照射により可視化した。

T4リガーゼ処理(37°Cで1時間、30μlの反応容量中に3単位のT4リガーゼ)の結果は、DNAフラグメントの分子量の増加を示すと共に、ヒトの血液から単離したDNAがエキソヌクレオリティックな分解の影響をそれほど受けないと示している。

精製プラスミド(pCHV-E; 3.3μg; 1.5μl)を加えた8個の血液試料の結果はそれぞれ、EcoRI, BamHI, BglIIダイジェストに対して、既ての制限酵素がプラスミドを線状化したことを見ている。既ての制限酵素は9単位の酵素と共に、37°Cで1時間30μlの反応容量中でインキュベートした。

実験例B3：10個の異なる血液試料からのDNAの

单離

この実験例では、血液バンクから無作為に選択したヒトの血液の異なる10個の試料を出発材料として使用した。各試料において白血球細胞(WBC)の数は知られていた。プロトコルBに従って $50\mu\text{L}$ の試料からDNAを精製し、 $75\mu\text{L}$ のTEで溶離が生じた。単離したDNAの三分の一を1%アガロースゲルに直接適用し、残余部分($2\mu\text{L}$)をPCR用に使用した。

$3\mu\text{L}$ のLMM-DNA($6\mu\text{g}$)を $50\mu\text{L}$ の各試料に加えた後に、同一の試料で同一の單離作業を実施した。この場合も $25\mu\text{L}$ の溶出液(eluate)($75\mu\text{L}$)をゲルに直接適用した。 $25\mu\text{L}$ の溶出液の他の部分を最初にT4 DNAリガーゼで処理し(37°C で1時間、 $30\mu\text{L}$ の反応容積中に2U)、次いで同一ゲルに適用した。

血液試料1~10の白血球細胞(WBC)の含量は以下の通りであった。

実験例B5: ヒトの血液からのDNA及びssRNAの同時精製(再現性)

DNA及びRNAを再現し得る形でヒトの血液から精製できることを示すために、一人のヒトから得た各々が $50\mu\text{L}$ の6個の血液試料をプロトコルYに基づいて処理し、RNAsin($0.50\mu\text{L}$)を含む $75\mu\text{L}$ のTEでNAを溶離した。溶出液の一部 $25\mu\text{L}$ を中性1%アガロースゲルに適用して、電気泳動にかけた。結果は、DNA及びRNAが検出できることを示している。

実験例B6: ヒトの血液(10個の異なる試料)からのDNA及びssRNAの同時精製

10人の異なるヒトから得た $50\mu\text{L}$ の血液試料(実験例B3参照)をプロトコルYに基づいて処理し、 $0.50\mu\text{L}$ のRNAsinを含む $40\mu\text{L}$ のTEでNAを溶離した。溶出液の一部 $30\mu\text{L}$ を中性1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけた。結果は、DNA及びRNAが検出できることを示している。

| 試料番号 | WBC $\times 10^9/\text{L}$ | 試料番号 | WBC $\times 10^9/\text{L}$ |
|------|----------------------------|------|----------------------------|
| 1 | 4.9 | 6 | 8.3 |
| 2 | 5.1 | 7 | 8.5 |
| 3 | 5.9 | 8 | 9.2 |
| 4 | 6.7 | 9 | 10.3 |
| 5 | 7.7 | 10 | 10.5 |

実験例B4: ヒトの白血球粗胞中のヒトの β -Zヨビン遺伝子検出用ポリメラーゼ連鎖反応

プロトコルBに基づいてヒトの全血から単離したDNAがTag-DNAポリメラーゼに対して良好な基質であることを示すために、実験例B3に従って10個の異なる血液試料から単離した $2\mu\text{L}$ のDNAを、 β -ヨビン特異的プライマーを含むPCRで処理した。PCRは32サイクルからなり、各サイクルは 94°C で1分間、次いで 65°C で3分間であった。アンプライマーの一部(50%)を2%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけた。120 bpのアンプライマー及びプライマー帯を検出することができた。

実験例B7: ヒトの血液からのDNA及びssRNAの同時精製

外因性RNA源をヒトの血液試料に加えた。哺乳動物の細胞又は細菌を外因性RNA源として使用した。プロトコルYに基づいて試料からNAを単離し、RNaseA($40\text{ng}/\mu\text{L}$ の溶離用緩衝液)の存在下又は存在下において、 $50\mu\text{L}$ TE + $0.5\text{ U}/\mu\text{L}$ RNAsinで溶離した。 $50\mu\text{L}$ の血液試料に対して 5×10^3 ラット10B細胞(Boo等、J.Gen.Viro. 69, 1988, 1179)を哺乳動物細胞として加え、 $50\mu\text{L}$ の血液に対してプラスミドpCMV-Eを含むE.coli細胞株HB101の $100\mu\text{L}$ 一晩培養物の細胞ペレットを細菌として加えた。

結果は、哺乳動物のssRNA(18S及び28SリボソームRNA)も細菌ssRNA(16S及び23SリボソームRNA)もヒトの全血から精製され得ることを示している。

更には、ゲノムDNA及びプラスミド(形態I)DNAが効率的に回収される。

セクションC: ヒト尿からのDNA/RNA精製

ヒトの尿ではNAは、例えばウイルスまたは細菌中や尿路由来の細胞中に存在し得る。量は普通、エチジウムプロミド/NA複合体のアガロースゲル電気泳動及びUV照射による検出が不可能なほど少ない。ヒト尿からDNAを精製し得ることを示すために、マイクログラム量の精製DNAを尿に添加し、続いてプロトコルBに従ってDNAを単離した(実施例C1)。ヒト尿からDNAとRNAとを同時に精製し得ることを示すために、培養した細菌(小アラスミド保有)を尿に添加し、続いてNAをプロトコルYに従って単離した(実施例C2)。

実施例C3は、プロトコルYにより核酸結合性固相としてシリカと共に、GuSCNに替えてKI、NaI及びNaSCNのような別のカオトロビック物質を用いてもヒト尿からDNAを精製し得ることを示す。

実施例C1: ヒト尿からのDNA精製

3μlのLMM DNA(6μg)を、任意に選択した10の、

あれば分解されるだろうと予想できた。従って、分解は精製時にではなく、それ以前の尿/DNA混合物調製時に起こったと考えられる。次の実施例(C2)は、(裸の場合に反して)細胞中に存在するDNAは、特に α -sRNAまでもが尿試料第10号から有効に回収できることを示す。

実施例C2: ヒト尿からのDNAと α -sRNAとの同時精製

この実験では、実施例C1で用いたのと同じ10の尿試料を、2.4kbのプラスミド(pCHV-E)を保有する細菌と混合した。混合物からNAをプロトコルYに従って単離し、かつ75μlのTE緩衝液中に0.5μl RNAsinを用いて溶離した。溶出物の1/3を1%アガロースゲルでの電気泳動に掛けた。溶出物の別の部分25μlを10Uの、pCHV-Eを直鎖化する制限酵素EcoRIで処理した(反応量30μlにおいて37℃で1時間)。この処理は40ng/μl RNase Aの存在下に行なった。電気泳動の結果は、23S及び18SリボソームRNA、並びに共有結合で閉じた形態(C1)及

様々な混濁度の50μlヒト尿試料に添加した(試料第4号、第5号、第6号及び第7号は澄明であり、試料第1号、第2号、第3号及び第8号は僅かに混濁し、試料第9号及び第10号は非常に混濁していた)。DNAをプロトコルBに従って単離し、75μlのTE緩衝液で溶離した。各溶出物の1/3を1%アガロースゲルに適用した。別の部分25μlを1.8UのT4 DNAリガーゼで(反応量30μlにおいて37℃で1時間)処理し、やはり上記ゲルに適用した。マーカーレーンはLMM DNA及びMMW DNAをそれぞれ含む。マーカーレーン中のLMM DNAの量(2μg)は、抽出効率100%で観察されるべき量を表す。

実験結果は、プロトコルBでヒト尿からDNAを有効に精製し得、得られるDNAはT4 DNAリガーゼのための優れた基質であることを示す。

尿試料第10号から単離したLMM DNAは明らかに分解されていた。しかし、(この実験で用いたような)裸のDNAは尿試料中にヌクレアーゼが豊富で

び直鎖形態(C1)のプラスミドDNAを示す。

実施例C3: 他のカオトロビック物質を用いるDNA精製

ヒト尿(50μl)を、400μlのカオトロビック物質、溶離(lysis)緩衝液LG*及び1μgのpGEM3p24 DNAと混合した。得られた懸濁液を全部、プロトコルYによりDNAを精製するべく500μlのカオトロビック物質(表C3.1参照)及び40μlのSiO₂に混合添加した。尿から単離したDNAの量を、アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。DNA回収効率を実施例A5に述べたようにして判定した結果を表C3.1にまとめる。

様々なカオトロピック物質をシリカと共に用いて行なった、ヒト糞試料からのプラスミドDNAの回収(表A5.1の凡例も参照)。

| 試料番号 | 使用カオトロピック 物質 | pGEM3p24 CII の回収 | pGEM3p24 CII の回収 |
|------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | GaSCN/SiO ₂ | + | + |
| 2 | KI 3M/SiO ₂ | + | + |
| 3 | NaI 3M/SiO ₂ | + | + |
| 4 | NaSCN 3M/SiO ₂ | + | + |

表C3.1は、CII型及びCI型プラスミドDNAのDNAバンドの回収率が同じであったことを示す。

実施例D1: ヒト糞便からのロタウイルスdsRNA精製

■

レオウイルス(Reoviridae)科のウイルスは、二重鎖RNAから成るゲノムを有する。この科に属する重要な病原体は、重症の下痢を惹起し得、従って糞便試料中に大量に存在するロタウイルスである。ロタウイルスのゲノムは11個のdsRNAセグメントから成り(Hishino in J. Clin. Microbiol.

ヒト血液またはヒト尿に添加し、アプロトコルBまたはアプロトコルYによって精製した。いずれの抽出作業も4回ずつ行なった。DNAを50μlのTE緩衝液中に溶離し、25μlを1%アガロースゲルでの電気泳動に掛けた。マーカーレーンは500ngのM13 ssDNAを含有する。

この実験の結果から、一重鎖DNAをヒト血液、血清または尿からアプロトコルYによって、また程度はより低いがアプロトコルBによっても単離できることが判明した。

セクションF: NAのケイ藻土への結合

ケイ藻土の組織はほぼ完全にSiO₂から成るので、ケイ藻土が使用シリカとして有用であるかどうか調べた。5種の異なる市販ケイ藻土製品[Janssen Biochimica, Louvain, BelgiumのCelaton FW14, Celaton FW50, Celaton FW60, Celite (AK)及びCelite 521]各10gを50mlの2回蒸留水及び500μlの37% HClと混合し、得られた懸濁液をオートク

1, 1985, 425参照)、これらのdsRNAセグメントはアプロトコルBによって糞便上清から単離可能である。下痢試料を12000×gで2分間遠心分離して得た上清100μlを用いて単離を行なった。

ロタウイルスに感染したことが(Wellcomeロタウイルスラテックス試験及びKallestad Path-finderロタウイルス直接抗原検出系によって)確認された6人の異なる患者から採取した試料を用いた結果、dsRNAを抽出できることが判明した。

最初の遠心分離ステップを省略し、糞便試料を直接アプロトコルBまたはYのためのインプット物質として直接用いても同様の結果(普通、ロタウイルスdsRNA回収率はより高い)が得られた。

実施例E1: ヒト血液、血清及び尿からのssDNA精製

臨床試料から一重鎖DNAも単離できることを示すために、1μg(4μl)の精製ファージM13 DNA(Boehringer社のM13mp9 DNA)を50μlのヒト血清、

レープで20分間121°Cに加熱した。実施例F1及びF2において、上記のように生成した懸濁液をアプロトコルYによるNA抽出に用いた。

実施例F1: ヒト血液からのNA単離

ヒト血液を、プラスミドpCMV-Eを保有するE. coli HB101細胞と混合し、一晩経過した培養物100μlの細胞ペレットを50μlの血液に添加した。50μl試料を、アプロトコルYによるNA抽出のためのインプット物質として用いた。40μlのSCに替えて、40μlの上記ケイ藻土懸濁液を用いた。NAを75μlのTE緩衝液中に、RNase阻害物質を用いずに溶離し、20μlの溶出物を直接ゲルに付与した。別の20μlの溶出物を、9UのBamHIを作ったRNase A(40ng/μl)で反応量25μlにおいて37°Cで1時間処理してからゲルに付与した。

マーカーレーンは1μgのMMW DNAを含有する。得られた結果から、ケイ藻土懸濁液がSCに類似のNA結合特性を有することが判明した。dsDNA(成

分 I 分子)と ssRNA(23S 及び 16S rRNA)との両方が結合した。プラスミド DNA は、BamH I によって完全に直鎖化される(成分 III)ほど十分に純粹であった。

実験例 F2: グラム陰性菌からの NA 精製

ヒトにおいて疾病を惹起することが知られている 9 種類の異なるグラム陰性菌種を固体寒天プレート上で培養した。上記各細菌種を 5~10 μl ずつプレートから搔き取って、プロトコル Y による NA 抽出のためのインプット物質として用い、また 40 μl の SC かまたは 40 μl の Celite 521 淀粉液を NA キャリヤーとして用いた。

SC を用いた抽出は最初の洗浄の間に停止しなければならなかったが、これは、たとえ(3 分を超える)長時間溶形成を行なったとしてももはや NA シリカ複合体を均質化し得なくなつたからである。他方、Celite 521 を用いた抽出は問題なく続行することができたが、これはおそらくケイ藻土の粒

径が SC 粒子の粒径より大きかつたためであろう。NA を 70 μl の TE 缓衝液で、RNase A を用いずに溶解し、溶出物の一部(20 μl)を 1% アガロースゲルでの電気泳動に掛けた。

マーカーレーンは 1 μg の HMM DNA を含有する。次のような細菌に関する結果を得た。

1: Campylobacter pylori

2: Yersinia enterolyticus type 3

3: Neisseria meningitidis

4: Neisseria gonorrhoeae

5: Haemophilus influenzae type b

6: Klebsiella pneumoniae

7: Salmonella typhimurium

8: Pseudomonas aeruginosa

9: Escherichia coli K1-083

この方法で、HMM 細菌 DNA 及び rRNA を検出することができた。

セクション G: Escherichia coli JM101 の DNA/RNA

結果

グラム陰性菌からの NA の単離が、本発明により可能である。細菌細胞中には、高レベルの高分子量 DNA(HMM DNA)及びリボソーム RNA が存在する。実験例 G1 は、細菌細胞から NA を、NA 結合性固相としてシリカと共に様々なカオトロビック物質を用いて精製できることを示す。

実験例 G1: NA 結合性固相として様々なカオトロビック物質及びシリカを用いて行なう細菌細胞からの NA 単離/精製(内在)

一晩経過した細菌培養物 JM101 50 μl から NA を、900 μl のカオトロビック物質及び 40 μl の SiO₂ の存在下に単離した。高レベルの HMM DNA 及び内在リボソーム RNA(16S 及び 23S)が、エチジウムプロミドで染色したゲルの UV 照射によって単離 NA を検出することを可能にする。単離はプロトコル Y に従って行ない、溶出 NA の 25%(40 μl 部分)をアガロースゲル上で解析した。

表 G1

様々なカオトロビック物質をシリカと共に用いて行なう細菌細胞試料からの HMM DNA 及び rRNA 回収の相対効率

| 試料番号 | 使用カオトロビック物質 | HMM DNA 回収の相対効率 | rRNA 回収の相対効率 |
|------|-------------|-----------------|--------------|
| 1 | 3M KI | 1 | >1 |
| 2 | 3M NaI | 1 | 1 |
| 3 | 3M NaSCN | 1 | 1 |

結果:

アガロースゲル解析の結果を表 G1 にまとめる。HMM DNA 及び rRNA 回収の定義を、シリカと共に用いるカオトロビック物質が CsSCN であった場合と比較した。表 G1 の "1" は、DNA または RNA 回収の効率が同等であることを表す。表 G1 中の ">1" は回収効率がより高いことを表す。

細菌細胞からの RNA 単離のための基準として、E. coli rRNA マーカー(Boehringer)を用いた。

セクション H: カオトロビック物質としてグアニジニウムチオシアネートと、NA を結合させ得る別の固相と用いる DNA 精製

CsSCN 及び幾つかのシリカ誘導体またはラテックス粒子(“材料及び方法”参照)を用いて NA 単離

/精製を行ない得ることを示すために、純粋なプラスミドを低塩基緩衝液 (Tris 10mM-EDTA 1mM, pH 8.0)に添加し、その後プロトコルYに従って単離したが、その際ステップ7及び9は省略した(TEでの溶離を行なわなかった)。結合したNAを作ったシリカ/ラテックス粒子をPCR反応混合物中に導入した。単離したDNAはPCR法によって検出し得る。

実験例IIは、カオトロビック物質としてのGuSCNと共に別の固相を用い、かつPCR法で検出を行なうことによってNAを精製し得ることを示す。

実験例III: GuSCN及び別の固相を用いるDNA精製

50μlのTris 10mM-EDTA 1mM(pH8.0)中に存在する0.5μgのpGem3p24を、80μlのシリカ懸濁液または80μlのラテックス懸濁液(“材料及び方法”参照)及び900μlの溶菌緩衝液L6と混合した。

プロトコルYにより洗浄し、かつ56°Cで乾燥した後(溶離ステップ省略)、ベレットを50μlの水中に再懸濁した。プラスミドシリカ懸濁液の20

μl部分を、HIV特異的プライマー(“材料及び方法”参照)の存在下にPCR混合物中に用い、5μlの10倍濃縮PCR緩衝液と、1μlの10mM dNTPと、2単位のTaq DNAポリメラーゼと、最終量を50μlとする量の水とを添加して増幅反応を開始させた(95°Cで1分、37°Cで1分、更に72°Cで3分を1周期とする)。

30周期後、反応混合物から10μlアリコートを取り分け、2%アガロースゲル上で解析した。ラテックス粒子でNAを単離した場合、シリカで単離した場合のようなベレットは得られなかつた。

1mlの洗浄液L2を300μlの70% EtOHと混合したところ、二つの液相間にラテックス含有バンドが見いだされた。ラテックス粒子はその色によって検出可能である。単離したラテックス含有画分を70% EtOHで2回洗浄し、遠心分離すると、該画分はEppendorf管内で小さいベレットを形成した。

表II

カオトロビック物質としてグアニジニウム
ナオシニアートと共に別の固相を用いて里離
したDNAの、PCR増幅及びゲル解析による検出

| 試料番号 | NA結合性固相 | 増幅後のHIV p24 DNA (LMM DNA)の検出レベル |
|------|---------------|------------------------------------|
| 1 | 粗シリカ(対照) | ++ |
| 2 | 12 MAAM-C2 | + |
| 3 | 12 MAAM-C3 | + |
| 4 | 12 MAAM-C4 | + |
| 5 | 12 MAAM-C8 | ++ |
| 6 | 12 MAAM-C8 | + |
| 7 | 12 MAAM-C10 | + |
| 8 | 12 MAAM-C18 | ++ |
| 9 | VQ 69(親水性) | ++ |
| 10 | VQ 588(疎水性) | ++ |
| 11 | ACY 1515(親水性) | + |
| 12 | ACF 27C(親水性) | + |
| 13 | ACN3red(親水性) | + |

凡例:

結果を表Ⅱにまとめる。30周期後、予想した290bp HIVアンプライマーフラグメントを全ての事例で観察した。フラグメントのサイズを、やはりゲル上に載置したマーカー \times 174 RF DNA HaeIII digest (Pharmacia)と比較した。

++: 純相として粗シリカを用いた場合(対照)と同じレベルのHIV特異的290bpフラグメントをアガロースゲル上に検出したことを表す。

+: 290bpフラグメントの検出レベルが対照の粗シリカの場合より低いことを表す。

セクションI: NA結合フィルター及びGuSCNを用いた精製。

プロトコルYによる核酸の単離では、SiO₂の替わりにNA結合フィルター(“材料及び方法”参照)を用い得る。

低塩基緩衝液(Tris 10mM-EDTA 1mM, pH8.0)中では通常DNAの放出が起こらないが、場合によって生じるこの問題点は、DNAを結合させたフィルターからDNAを溶離する替わりに該フィルターをPCR反応混合物中に挿入することによって排除できる。実験例IIは、NA結合フィルター及びカオトロビック物質としてのGuSCNを用い、かつPCR法で解析することによってNAを精製し得ることを示す。

実験例II: DNA結合フィルターを用い、かつPCR増幅による検出を行なうDNA単離/精製。

Tris 10mM-EDTA 1mM(pH8.0)50μl中の純粋なpGem3p24 DNA(濃度1μg, 0.01μg及び0.005μg)を、寸法1cm \times 1cmの3個のDNA結合フィルター及び

(アプロトコル Y**による)洗浄(遠心分離ステップ省略)及び58°Cでの乾燥の後、DNAを結合させたフィルターを直接PCR混合物中に導入した。HIV特異的プライマーの存在下に、PCRサイクラーで増幅を行なった。

反応混合物は更に、5 μl の10倍濃縮PCR緩衝液と、1 μl の10 mM dNTPと、2単位の *Taq* DNAポリメラーゼと、最終量を50 μl とする量の水とを含有する。続いて、増幅反応を開始させた。

30周期後、反応混合物から10 μl アリコートを取り分け(実施例II1参照)、2%アガロースゲル上で解析した。

表II

カオトロビック物質としてのCuSCNと共に既に既存のNA結合固相としてフィルターを用いて並置したDNAの、PCR増幅及びゲル解析による検出

| 試料番号 | NA結合性固相 | インプット DNA量 | 増幅後のHIV p24 DNAの量 |
|------|----------------|---------------|----------------------|
| 1 | Hybond N | 1.0 μg | + |
| 2 | Hybond N | 0.01 μg | 0 |
| 3 | Hybond N | 0.005 μg | 0 |
| 4 | ニトロセルロース | 1.0 μg | + |
| 5 | ニトロセルロース | 0.01 μg | 0 |
| 6 | ニトロセルロース | 0.005 μg | 0 |
| 7 | PVDF-millipore | 1.0 μg | ++ |
| 8 | PVDF-millipore | 0.01 μg | + |
| 9 | PVDF-millipore | 0.005 μg | + |

凡例:

結果を表IIにまとめた。予想した290bp HIVアンプライマー フラグメントを観察した。フラグメントを市販の *Xba* II と比較した。

++: アガロースゲル上で、エチジウムプロミドで強度に染色された290bpフラグメントを検出

+: 290bpフラグメントを検出

0: 290bpフラグメント検出せず

比較として: PCR増幅混合物に添加した7ngの精製pGenSp24 DNAは、“++”として定量される290bpフラグメントをもたらす。

第1頁の続き

②発明者 テイム・キエフィツ オランダ国、2593・ヘー・エー・デン・ハーグ、スタイル
エサントストラート・183

②発明者 ベテル・フランクリン・レンス オランダ国、1015・ヘー・カー・アムステルダム・ブラウ
エルスフラフト・823